



IMMUNE RESPONSES OF TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS* BY WITH THE PROVISION OF XANTHONES EXTRACTED FROM MANGOSTEEN PEEL *GARCINIA MANGOSTANA*

Mardiana¹ dan Sutia Budi²

^{1,2} Department of Fisheries Faculty Agricultural Bosowa University
e-mail : mh.selle@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian ekstrak kulit buah manggis berupa xantone terhadap peningkatan respon imun pada ikan nila. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*, rancangan penelitian didesain menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pengamatan parameter uji berupa aktifitas fagositosis dan sintasan. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengevaluasi peningkatan respon imun non-spesifik pada ikan nila (*O. niloticus*) yang diekstrak dari kulit buah manggis. Hasil analisis ragam ANOVA menunjukkan bahwa ikan nila yang diberikan ekstrak xanton, berpengaruh nyata terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila ($P < 0.05$). Hasil uji lanjut W-Tukey menunjukkan bahwa tingkat kelangsungan hidup tertinggi ikan nila adalah pada pemberian xanton 2,10 ppm/ekor (perlakuan C) dan tidak berbeda dengan pemberian xanton 2,15 ppm/ekor (perlakuan D) tetapi berbeda terhadap pemberian xanton 2,5 ppm/ekor (perlakuan B) dan kontrol (perlakuan A). Hasil analisis ragam ANOVA menunjukkan bahwa aktivitas fagositosis juga berpengaruh nyata ($P < 0,05$) antara setiap perlakuan, hasil uji lanjut W-Tukey perlakuan kontrol berbeda terhadap perlakuan B, C dan D tetapi antar perlakuan B dan perlakuan D tidak berbeda.

Kata Kunci: Nila, Xanton, Fagosititas, Manggis, Respon Imun

Abstract

*This study aims to analyze the influence of the provision of extract the rind Mangosteen of xantone on increased response immun of Tilapia fish. The study is done in vitro and in vivo, The research using random design complete (RAL) with the observation parameters of phagocytosis test activity and survival rate. This research intended to evaluate the response immun non-spesifik on Tilapia (*O. niloticus*) extracted from mangosteen peel. The results of the analysis variety of ANOVA shows that nila fish given extract xanthones, had have real impact on survival nila fish ($P < 0,05$). Test results said W-tukey shows that survival highest nila fish is in the provision of xanthones 2,10 ppm / the tail (Treatment C) and are no different by the provision of xanthones by 2.15 ppm / the tail (Treatment D) but different to the provision of xanthones 2.5 ppm/the tail (Treatment B) and control (Treatment A). The results of the analysis variety of ANOVA shows that activity of phagocytosis also had have real impact ($P < 0.05$) between any treatment, test results said W-tukey treatment control different to treatment B, C and D but also between treatment B and treatment D not different.*

Keywords: tilapia, xantone, fagosititas, mangosteen, immune response

1. PENDAHULUAN

Salah satu jenis ikan air tawar yang memiliki prospek untuk dikembangkan adalah ikan Nila *Oreochromis niloticus*. Ikan nila memiliki banyak keunggulan untuk dikembangkan dibandingkan dengan jenis ikan lainnya karena sifat biologi yang menguntungkan seperti mudah berkembang biak, tumbuh cepat, dagingnya tebal dan kompak. Selain itu, ikan ini toleran terhadap

berbagai kondisi lingkungan serta mempunyai respon yang luas terhadap pakan. Produksi ikan nila di Indonesia sampai dengan tahun 2011 mencapai 639,300 ton (KKP, 2012). Di dalam negeri, ikan Nila juga digemari oleh karena itu telah banyak dibudidayakan, usaha budidaya ikan sering terjangkit adanya penyakit ikan yang tidak jarang menggagalkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan sehingga mengakibatkan kematian massal pada ikan yang dibudidayakan (gagal panen).

Penyakit ikan disebabkan adanya interaksi antara lingkungan, organisme patogen dan ikan yang tidak seimbang. Penyakit ikan dapat disebabkan oleh fisika, kimiawi, dan biologis (Feliatra *dkk.*, 2004). Penyakit yang diakibatkan oleh fisik maupun kimiawi pada umumnya tidak menular (non-infeksi) misalnya penyakit yang diakibatkan oleh kekurangan nutrisi, genetik, dan faktor lingkungan, sedangkan penyakit yang ditimbulkan oleh penyebab biologis kebanyakan menular (infeksi) seperti penyakit akibat infeksi parasit, bakteri, virus dan jamur.

Penyakit ikan biasanya timbul berkaitan dengan lemahnya kondisi ikan yang disebabkan beberapa faktor antara lain penanganan ikan, pakan yang diberikan sangat berlebihan dan keadaan lingkungan yang kurang mendukung. Usaha penanggulangan yang paling efisien adalah berupa pencegahan penyakit dengan cara pemberian imunostimulan. Imunostimulan adalah zat kimia, obat-obatan, stressor, atau aksi yang meningkatkan respon imun non-spesifik atau bawaan (innate-immune respon) yang berinteraksi secara langsung dengan sel dari sistem yang mengaktifkan respon imun bawaan tersebut (Syakuri *dkk.*, 2003). Imunostimulan dapat digunakan sebagai terapi tambahan untuk penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus, bakteri dan parasit serta membantu meringankan gejala penyakit infeksi, serta mempercepat proses penyembuhan pada ikan (Rantetondok, 2002). Jika belum terkena penyakit, imunostimulan bisa dipakai sebagai tindakan preventif untuk mencegah penyakit, serta untuk meningkatkan daya tahan tubuh. Terapi tambahan disini berarti imunostimulan bukanlah merupakan obat utama yang melawan penyakit, tetapi hanya membantu mempercepat proses penyembuhannya saja. Namun demikian, imunostimulan akan lebih bermanfaat pada kondisi dimana sistem kekebalan tubuh mengalami penurunan. Salah satu imunostimulan yang mulai dikembangkan adalah ekstrak kulit buah manggis.

Aplikasi penggunaan ekstrak kulit manggis telah dilakukan pada manusia, namun pada organisme perairan (ikan dan udang) belum banyak. Kulit manggis merupakan cangkang yang dibuang oleh konsumen atau

dapat disebut dengan limbah hasil pertanian. Menurut Mardawati *dkk* (2010), kulit buah manggis mengandung senyawa Xanton yang cukup kuat sebagai antioksidan, antiproliferasi, dan antimikroba yang tidak ditemui pada buah-buahan lainnya. Selanjutnya Suksamran *dkk* (2003), penggunaan imunostimulan berupa pemberian Xanton yang diekstrak dari kulit buah manggis dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh baik spesifik maupun non-spesifik, karena dapat meningkatkan aktifitas fagositosis dari pertahanan seluler dan respon imun.

Oleh karena hal tersebut diatas, penelitian ini digunakan xanton yang diekstrak dari kulit buah manggis sebagai salah satu alternatif penanganan penyakit yang ramah lingkungan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi peningkatan respon imun non-spesifik pada ikan nila (*O. niloticus*) yang diekstrak dari kulit buah manggis sehingga mendukung pertumbuhan ikan Nila *O. niloticus*. Hasil penelitian ini diharapkan menghasilkan suatu model substitusi pakan yang optimal yang dapat menjadi paket teknologi yang tepat untuk budidaya guna meningkatkan produksi secara berkesinambungan. Dengan berbagai keuntungan yang ditimbulkan maka ampas tahu sebagai sumber pakan akan menjadi salah satu jawaban untuk menuju terciptanya sistem budidaya perikanan yang produktif dan berkelanjutan (*Sustainable aquaculture*)

2. METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Perikanan Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Bosowa Makassar dan ekstraksi Xanton dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sedangkan Uji Imunologi dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

Hewan uji berupa Ikan Nila diperoleh dari Unit Pembenihan di Kota Makassar. Kepadatan ikan Nila *O. niloticus* yang berukuran 10-12 cm yang dipergunakan 1 ekor per wadah, ditempatkan pada toples plastik bening yang bervolume 5 L sebanyak 12 buah, Akuarium penampungan air volume 100 L sebanyak 2 buah, saringan plankton ukuran 10

µm, timbangan, blender, elektrik, pipet, aerasi, kertas saring, cawan petri dan mikroskop.

Alat untuk ekstraksi menggunakan kertas saring whatman no. 40, timbangan elektrik, rotary evaporator dan erlenmeyer, Uji aktifitas fagositosis menggunakan mikroskop, mikropipet, incubator, oven, lampu spiritus, spoit (*gauge hypodermic needle*) haemocytometer, Sedangkan bahan yang digunakan adalah kulit buah manggis, ethanol, akuades, *Aeromonas hydrophila*, *Micrococcus luteus*, PBS pH 7,4. Nitroblue Tetrazolium (HBSS) (Gibco) ininus phenol red, Methanol, DMSO₄ (Dimethyl sulfoxide), Phenol Red Solution (PRS).

Penelitian dilakukan sebanyak tiga tahapan kerja yaitu tahap ekstraksi xanton dari kulit Manggis, selanjutnya injeksi larutan uji ke hewan uji dan tahapan ketiga berupa pemeliharaan hwan uji selama 2 bulan.

Pembuatan ekstrak kulit buah manggis dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Bagian kulit yang diambil adalah bagian kulit terluar, kemudian kulit buah dicuci hingga bersih lalu dikeringkan dengan suhu ruangan dan bantuan cahaya matahari selanjutnya dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan saringan hingga didapatkan bubuk halus berupa tepung. Metode ekstrak Xanton dari kulit Manggis menggunakan metode ekstraksi etanol (Doughari, 2006). Ekstrak yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji kualitatif kandungan senyawa (uji fitokimia), seperti, alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan β-glucan dengan menggunakan metode Harbonne (1987). Selanjutnya sebanyak 1 ml ekstrak dilarutkan dalam 1-2 ml methanol 50% dan dipanaskan pada suhu 50 °C kemudian didinginkan dan ditambahkan logam Mg ke dalam tabung reaksi tertutup, Kemudian ditambahkan 4-5 tetes larutan HCl pekat. Adanya Flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna merah, kuning atau jingga.

Penyuntikan immunostimulan berupa xanton diekstrak dari kulit buah manggis dengan konsentrasi larutan 2:1 (Ekstrak Xanton : Aquadest), penyuntikan ikan uji menggunakan spoit syringe berukuran 1 ml dilakukan secara intramuscular. Masa pemeliharaan selama 1 bulan. Penggantian air sebanyak 10-25% total volume per hari.

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan masing-masing tiga ulangan. Perlakuan yang diujikan adalah perbedaan dosis, yaitu perlakuan A (0%, kontrol menggunakan larutan Fisiologis 0,85%), perlakuan B (2,05 ppm/ekor), perlakuan C (2,10 ppm/ekor) dan perlakuan D (2,15 ppm/ekor).

a. Indeks Fagositosis

Pengukuran Indeks fagositosis menggunakan Anderson dan Siwicki (1995). Pengukuran Indeks Phagosititas dengan mengambil darah ikan sebanyak 50 µl darah dimasukkan kedalam mikrotube, ditambah 50 µl suspense *Staphylococcus aureus* dalam PBS dicampurkan hingga homogen menggunakan vortex serta diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya dibuat sediaan ulas dengan mengambil sampel 5 µl larutan darah dan dikering udarakan. Sediaan ulas difikasi dengan methanol selama 5 menit kemudian dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Setelah dikering dilanjutkan pewarnaan dengan pewarna giemsa selama 15 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan diantara kertas tissue. Aktivitas fagositik dihitung berdasarkan persentase sel yang menunjukkan proses fagositosis dari 100 jumlah sel yang terhitung. Perhitungan indeks fagosititas melalui rumus sebagai berikut:

$$\text{Indeks Phagosititas (\%)} = \frac{\text{Jumlah Sel Phagosititas}}{\text{Jumlah Sel Keseluruhan}} \times 100$$

b. Kelangsungan Hidup

Kelangsungan hidup (SR) yaitu persentase jumlah ikan Nila yang masih hidup setelah diberi pakan. Penghitungan SR dilakukan pada akhir penelitian. Menurut Effendi (1997) penghitungan kelangsungan hidup dirumuskan sebagai berikut :

$$\text{SR (\%)} = \frac{\text{Jumlah ikan pada waktu } t}{\text{Jumlah ikan pada waktu awal}} \times 100$$

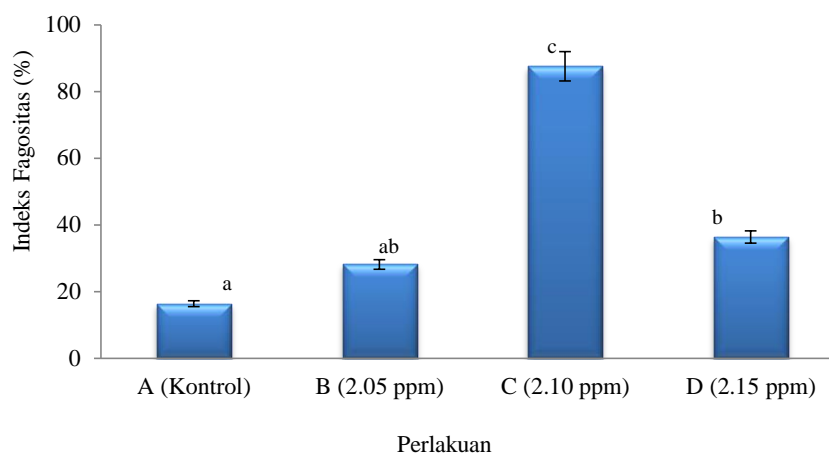
Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan uji lanjut W-Tuckey apabila terdapat pengaruh perlakuan ($P < 0,05$). Sebagai alat bantu digunakan SPSS versi 15 *for windows*, sedangkan untuk penyajian grafik menggunakan Microsoft Excel 2007.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Indeks Fagositik Ikan Nila *Oreochromis niloticus*

Immunitas atau kekebalan merupakan sistem mekanisme pada organism yang melindungi tubuh dari pengaruh biologis luar dengan mengidentifikasi dan membunuh patogen serta sel tumor. Sistem ini mendeteksi berbagai macam pengaruh biologis luar yang luas, organisme akan melindungi tubuh dari infeksi bakteri, virus sampai cacing parasit serta menghancurkan zat-zat asing dan memusnahkan dari sel organisme yang sehat dan jaringan agar tetap dapat berfungsi seperti biasa. Yuwono (2008), salah satu yang berperan dalam sistem imun pada ikan yaitu sel darah, yang membawa oksigen, bahan makanan, produk ekskresi melalui tubuh pada jaringan dan organ yang berbeda. Darah terdiri dari sel-sel darah dan plasma darah yang berperan dalam sel darah putih. Sel darah putih dikenal dengan leukosit. Leukosit berbeda dengan sel lain di dalam tubuh karena leukosit tidak berasosiasi secara ketat dengan organ atau jaringan tertentu. Melainkan bekerja secara independen seperti organism sel tunggal dan mampu bergerak secara bebas dan berinteraksi dan menangkap serpihan seluler, partikel asing atau mikroorganisme penyusup.

Fagositosis adalah suatu proses aktif yang dimulai dengan *engulf* patogen oleh sel macrofage, kemudian patogen akan dimasukkan kedalam fagosome yang akan mengalami reaksi oksidasi-reduksi sehingga derajat keasamannya meningkat. Selain fagosome di dalam macrofage juga terdapat lysosom yang berisi lebih dari 50 macam enzim yang berfungsi untuk mencerna zat-zat yang masuk kedalamnya. Enzim yang paling khas didalam lysozom yaitu *acid phosphatase*. Makrofage yang teraktifasi mempunyai jumlah lysozom yang meningkat dan menghasilkan serta melepaskan interleukin-1 yang sangat berperan dalam proses inflamasi. Selanjutnya macrofage akan mempresentasikan antigen kepada sel limfosit T sebagai awal *Antigen Presenting Cells* dan ini merupakan awal respon imun spesifik (Raa, 1992). Pemeriksaan Indeks Fagositik berguna untuk melihat kondisi kesehatan ikan. Alifuddin (1999), pemeriksaan darah penting untuk memantapkan diagnostik suatu penyakit. Komponen-komponen darah akan mengalami perubahan apabila terjadi gangguan fisiologis ikan yang akan menentukan status kesehatan ikan. Perubahan komponen darah akan terjadi, baik kuantitatif maupun kualitatif. Oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui gambaran darah ikan dan mengetahui status kesehatannya serta prediksi untuk dilakukannya pencegahan penyakit. Hasil pengukuran Indeks Fagositik ikan Nila dengan pemberian Xanton yang diekstraksi dari kulit buah Manggis *Garcinia mangostana* menunjukkan nilai berbeda pada setiap perlakuan. Nilai rata – rata aktivitas sel fagositik dapat dilihat pada Gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Grafik Aktivitas Fagositasi ikan Nila *Oreochromis niloticus* pada berbagai dosis Xanton yang diekstraksi dari kulit buah Manggis *Garcinia mangostana*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat pengaruh dosis Xanton yang diekstraksi dari kulit buah Manggis *Garcinia mangostana* ($P < 0.05$) terhadap aktivitas fagositasi darah Ikan Nila *O. niloticus*. Hasil uji lanjut menunjukkan perlakuan A (kontrol) tidak berbeda nyata dengan perlakuan B (2,05 ppm) namun berbeda dengan perlakuan C (2,10 ppm) dan D (2,15 ppm), sedangkan perlakuan B dan D tidak berbeda nyata. Gambar 1 diatas, memperlihatkan Aktivitas Fagositasi ikan Nila dengan nilai tertinggi pada perlakuan C (2,10 ppm) sebesar $87,54 \pm 5,46$ %, kemudian D (2,15 ppm) sebesar $36,32 \pm 6,31$ %, perlakuan B (2,05 ppm) sebesar $28,12 \pm 8,31$ %, dan nilai terendah pada perlakuan A (kontrol) sebesar $16,34 \pm 3,48$ %.

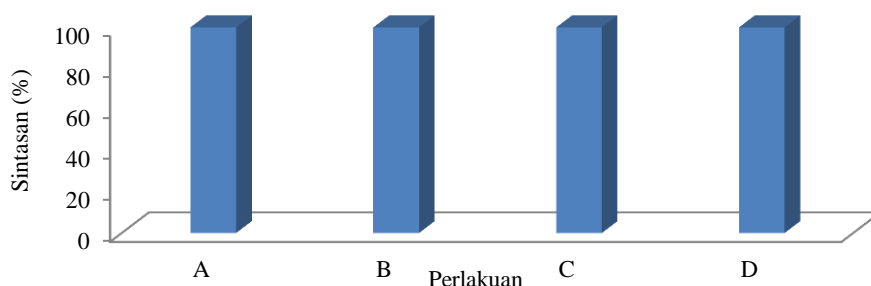
Gambar 1, menunjukkan tingginya nilai Indeks Phagositasi pada perlakuan C (2,10 ppm) menunjukkan adanya peningkatan sistem kekebalan tubuh pada ikan Nila. Pengaruh ekstrak Xanton dari kulit Manggis pada dosis yang tepat akan meningkatkan aktivitas sel fagosit dari hemosit. Hal ini sesuai dengan pendapat Johnny dkk., (2010), bahwa peningkatan aktifitas fagositosis dapat terjadi pada awal respon dari pemberian imunostimulan atau awal terjadinya infeksi, sedangkan jumlah yang rendah diakibatkan dari ikan yang mengalami stres, kekurangan protein dan vitamin, serta infeksi kronis. Sistem imun diindikasikan dapat meningkatkan aktivitas fagositosis dan pertahanan lain. Lukistyowati (2011) mengatakan bahwa fagositosis terhadap

patogen melalui aktivitas proses penelanan, pembunuhan dan pencernaan patogen. Ada tiga fase utama dalam fagositosis yaitu pelekatan patogen pada permukaan sel darah, penelanan melalui fagositosis dan penghancuran partikel dalam fagosom. Pelekatan suatu patogen pada membran fagosit merupakan suatu prasyarat untuk mempermudah dan biasanya relatif berlangsung secara pasif.

Aktifitas fagositosis ditandai dengan teknik pewarnaan bakteri yang terfagosit dalam neutrophil. Dalam pewarnaan antara sel yang aktif dan yang tidak aktif akan terwarnai. Nilai aktifitas fagositosis merupakan salah satu indikator untuk menentukan patogenitas bakteri yang difagosit (Wulansari, 2009). Semakin rendah nilai aktifitas fagositosis maka semakin patogen bakteri tersebut. Proses fagositosis diawali oleh pergerakan (*kemotaktik*), pelekatan (*adhesi/attachment*), penelanan (*ingestion*), degranulasi dan pembunuhan (*killing*). Inisiasi pergerakan karena dilepaskannya zat mediator tertentu yaitu factor leukotaktik/kemotaktik dari antigen/neutrophil/makrofag sebelumnya telah berada di lokasi antigen. Proses penempelan hingga penghancuran terlihat dilakukan oleh sel-sel fagosit seperti monosit dan neutrophil. Proses penelanan bakteri terjadi karena sel fagosit membentuk tonjolan pseudopodia, membentuk kantong yang mengelilingi bakteri sehingga terperangkap dalam vakuola fagosom, dalam sel fagosit ini, bakteri akan

didegradasi oleh fagolisosom (Bratawijaya, 2002)

Tingkat Kelangsungan Hidup Ikan Nila *Oreochromis niloticus*



Gambar 2. Grafik Tingkat Kelangsungan Hidup ikan Nila *Oreochromis niloticus* pada berbagai dosis Xanton yang diekstraksi dari kulit buah Manggis *Garcinia mangostana*

Gambar 2., diatas menunjukkan semua hewan uji selama penelitian memiliki tingkat kelangsungan hidup 100 % yang berarti perlakuan dosis xanton tidak memberikan pengaruh pada sintasan ikan Nila.

4. KESIMPULAN

Pemberian Xanton yang diekstraksi dari kulit buah Manggis *Garcinia mangostana* pada ikan Nila *Oreochromis niloticus* memberikan pengaruh yang baik terhadap peningkatan aktivitas fagositosis sehingga dapat meningkatkan immunitas ikan Nila. Disarankan dosis terbaik tidak melewati 2,10 ppm, karena setelah kisaran dosis tersebut tidak memberikan pengaruh terhadap peningkatan fagositosis dan sintasan ikan Nila.

5. DAFTAR PUSTAKA

Affandi R, Tang U.M. 2002. *Fisiologi Hewan Air*. Riau : Uni Press.

Alifuddin,M. 1999. Peran Imunostimulan (lipopolisakarida, saccharomycesvises cerevisae dan levamisol) pada gambaran Respon Imunitas Ikan Jambal Siam (*Pangasius Hypophthalmus*).

Ardeson, D.P. dan A.K Siwicki. 1993. Injection or Immersion Delivery of Selected Immunostimulant to Trout Demonstrate Enhancement of Non specific Defence Mechanism and

Tingkat kelangsungan hidup ikan Nila selama penelitian menunjukkan nilai 100 % yang berarti selama penelitian tidak ditemukan ikan yang mati. Hal ini berarti bahwa respon Xanton dapat diterima sangat baik untuk menunjang kelangsungan hidup ikan Nila.

protective Immunity In Disease in Asian Aquaculture II. Sharif, M.J., R. Arthur, R.P.Subasinghe (ens.). Fish Health Section Asian Society, p. 413-426.

Bratawijaya, K.G. 2002. *Imunologi Dasar*. Edisi Kelima. Balai Penerbit FK-UI. Jakarta. 457 hal.

Brown, K.M.T. 2000. *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publisher. The Netherland.

Effendie, M.I. 1997. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara. Yogyakarta.

Feliatra, Efendi, I, Suryadi, S. 2004. Isolasi dan identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscoguttatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan. *Jurnal Nature Indonesia* 6(2): 75-80.

Harbonne. 1987. *Metode Fitokimia*. ITB : Bandung.

Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Penerjemah : Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Yayasan Sarana Wahajaya. Jakarta. pp 1385 –1386 .

Johnny, F. D. Roza dan I. Mastuti. 2010. Aplikasi Imunostimulan Untuk Meningkatkan Imunitas Non-Spesifik Ikan Kerapu Macan (*Epenephelus fuscogutatus*) Terhadap Penyakit Infeksi di Hatcheri. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 945-949.

- Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. 2012. Statistik Ekspor Hasil Perikanan Menurut Komoditi, Provinsi dan Pelabuhan Asal Ekspor. Laporan. Jakarta.
- Lukistiyowati, I. 2011. Efektivitas Bawang Putih (*Allium sativum*) Untuk Meningkatkan Ketahanan Tubuh Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Terhadap Penyakit *Aeromonas septicemia*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. (tidak diterbitkan).
- Mardawati, E., C.S. Achyar, dan H. Marta. 2008. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kec. Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya Laporan Akhir Penelitian Peneliti Muda. Lembaga Penelitian Universitas Padjajaran. Bandung. 29 hal.
- Raa, J., 1996. The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. Reviews in Fisheries Science, 4(3), 229-288. CRC Press.
- Rantetondok, A. 2002. Pengaruh Immunostimulan β -Glucan dan Lipopolisakarida terhadap respon imun dan sintasan udang windu. (*Penaeus monodon* Fab) Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N., and Suksamrarn, A. 2003, Antimycobacterial Activity of Prenylated Xanthones from the Fruit of *Garcinia mangostana*, *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (7), 857-859 (*Gentianaceae*), Drukkerij Elinkwijk bv, Utrecht, pp 109 –114.
- Syakuri, H., Triyanto dan K.H. Niitimulyo. 2003. Perbedaan Daya Tahan Non Spesifik Lima Spesies Ikan Air Tawar Terhadap Infeksi *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada Vol V (2): hal 1- 10.
- Yuwono, T. 2008. Biologi Molekular. Erlangga. Jakarta.
- Wulansari. 2009. Pengaruh Ekstrak Air dan Ethanol *Alpinia* spp terhadap aktifitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Macrophage yang Diinduksi dari Bakteri *Stapilococcus Epidermis* Secara In Vitro. Pusat Penelitian Biologi LIPI. Bogor.